

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

ADHEZIVNI *MOONLIGHTING* PROTEINI U BAKTERIJA

ADHESIVE MOONLIGHTING PROTEINS IN BACTERIA

SEMINARSKI RAD

Bernardo Kerečeni

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Biljana Balen

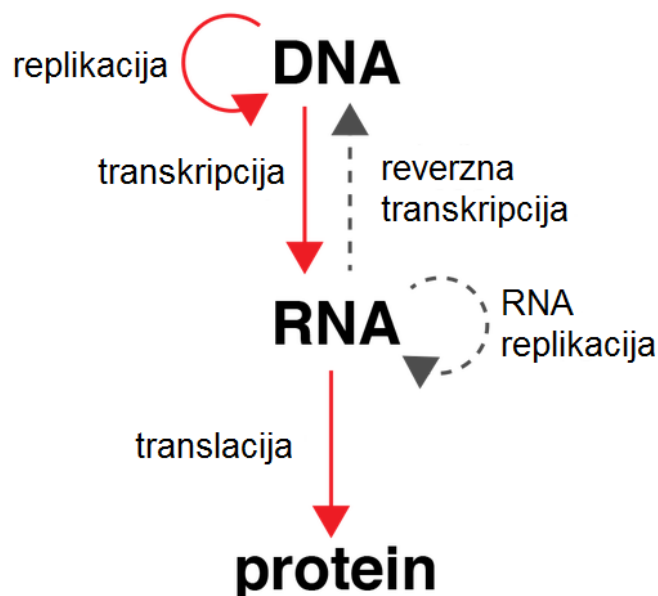
Zagreb, 2017.

Sadržaj

Sadržaj	1
1. Razbijanje dogme „jedan gen – jedan protein – jedna funkcija“	2
2. Molekulska mnogostranost – definiranje <i>moonlighting</i> proteina	4
3. Mehanizmi višezadačnosti <i>moonlighting</i> proteina.....	5
3.2. Oligomerizacija	6
3.3. Stvaranje kompleksa.....	7
3.4. Diferencijalna ekspresija u različitim tkivima	7
3.5. Različitost funkcija u ovisnosti o koncentraciji liganda	8
3.6. Preklapajuća vezna mjesta.....	8
3.7. Regulacija vlastite ekspresije.....	9
4. Biofizička i biokemijska osnova <i>moonlighting</i> fenomena.....	10
4.1. Strukturalna fleksibilnost i intrinzično neuređeni proteini	10
4.2. Posttranslacijske modifikacije kao ključ u ispoljavanju alternativnih funkcija	10
4.3. Utjecaj točkastih mutacija	11
4.4. Genske duplikacije i homologni proteini s različitim ulogama	11
5. Bakterijski adhezivni proteini – primjeri <i>moonlighting</i> -a unutarstaničnih proteina na staničnoj površini	12
5.1. Raznovrsnost uloga bakterijskih adhezivnih proteina	12
5.2. Problematika translokacije citoplazmatskih proteina na staničnu površinu	13
5.3. Uloga ionskih interakcija u adheziji proteina na staničnu površinu	14
6. Zaključne riječi – zašto istraživati <i>moonlighting</i> proteine?	15
7. Literatura.....	16
8. Sažetak	21
9. Summary	22

1. Razbijanje dogme „jedan gen – jedan protein – jedna funkcija“

Od razdoblja velikih otkrića DNA i središnjeg puta prijenosa informacija preko RNA do proteina, postalo je jasno kako svaki životni oblik koristi gotovo identičan set molekulskih alata kako bi ostvarilo isti cilj – ekspresiju gena, ključnih u određivanju specifičnih karakteristika jedinke i vrste. Stoga ne čudi kako je Francis Crick predložio naziv „centralna dogma molekularne biologije“ jednom tako temeljnom procesu (Crick, 1958). U tom antologijskom radu naveo je kako informacija jednom prenijeta iz nukleinske kiseline u protein više ne može biti prenesena na druge proteine ili natrag na nukleinske kiseline, što i dan danas vrijedi. Međutim, nije prošlo mnogo godina otkako su znanstvenici shvatili da stvari nisu toliko jednosmjerne ni jednostavne. Otkrićem RNA virusa i retrovirusa došlo je do spoznaje da je moguće usmjeriti sintezu molekule DNA informacijom pohranjenom u molekuli RNA (Kolakofsky, 2015). Takovi putevi prijenosa informacija od RNA do DNA, odnosno između molekula RNA, nazvani su specijalnim putevima, za razliku od općenitih koji uključuju dobro poznati tok informacija od DNA preko RNA do proteina (Sl. 1) (Crick, 1970).



Slika 1. Općeniti (crveni) i specijalni (sivi) putevi prijenosa informacija centralne dogme, preuzeto s www.quora.com

Ideja o centralnoj dogmi u znanosti postala je još manje vjerodostojna kad se u priču uključilo alternativno izrezivanje introna tijekom procesiranja eukariotske mRNA, što znači da određeni gen sa svojih nekoliko kodirajućih regija, egzona, može selektivno odabrati koje će ugraditi u budući proteinski produkt (*Berget i sur.; Chow i sur., 1977*). Znanstvenici su shvatili da se različite varijante proteina koji potječe od istog gena nalaze u različitim tkivima, u ovisnosti o okolini i potrebama dotičnih stanica (*Moller i sur., 1989*). Na taj način stanica zapravo štedi dostupnu DNA pakirajući više informacija u manji prostor. Taj fenomen je posebice izražen u virusima koji posjeduju *ambisense* RNA, kod koje je moguća translacija u oba smjera, uz sintezu različitih proteinskih produkata (*Bishop, 1986*)!

Osamdesetih godina prošlog stoljeća po prvi su puta opisani proteini nastali genskim fuzijama, odnosno stapanjem dvaju gena koji su prethodno bili razdvojeni nekodirajućom regijom (*Mitelman i sur., 2007*). U revijalnom radu Mitelmana i suradnika (2007) govori se o nastanku genskih fuzija translokacijama, intersticijalnim delecijama ili kromosomskim inverzijama. Napominje se ključna uloga takvih gena u evoluciji budući da njihovi produkti mogu iskazivati nove i različite funkcije od onih koje posjeduju proteini nastalih iz zasebnih gena. Tim načinom mogu nastati proteini ključni u razvoju tumora, a gledajući iz perspektive centralne dogme predstavljaju zanimljiv primjer kombiniranja dviju nepovezanih informacija prilikom čega dolazi do pojave novih svojstava prethodno nezapisanih u odvojenim genima.

Na kraju ovih primjera zaobilaženja centralne dogme i prije rasprave o *moonlighting* proteinima vrijedi spomenuti proteine čiji „život“ započinje posttranslacijskom proteolizom. Radi se o tipu aktivacije koji ponovno otvara mogućnost izrezivanja različitih fragmenata uz stvaranje proteina različitih funkcija (*Adams i sur., 2005*). Različiti proteolitički fragmenti istog proteina pronađeni su da mogu imati drastično različite uloge u organizmu, primjerice u razvoju Alzheimerove bolesti (*Vassar, 1999*). Otkriveno je da alternativni način cijepanja amiloidnog prekursornog proteina može dovesti do stvaranja takovog produkta koji postaje nadprosječno adhezivan i stvara plakove dobro poznate u napredovanju bolesti do stanja u kojem moždana masa počinje propadati.

Govoreći općenito, prethodno navedeni primjeri pojava koje zaobilaze klasični put „centralne dogme molekularne biologije“ nisu dotaknuli glavu temu ovog seminara – *moonlighting* proteine. U sljedećih nekoliko poglavlja pojasnit će se njihova definicija i specifično mjesto u nizu iznimaka koje mijenjaju pogled na taj pomalo nezgodno formuliran naziv za tako ključan proces prijenosa genske informacije od gena do proteina.

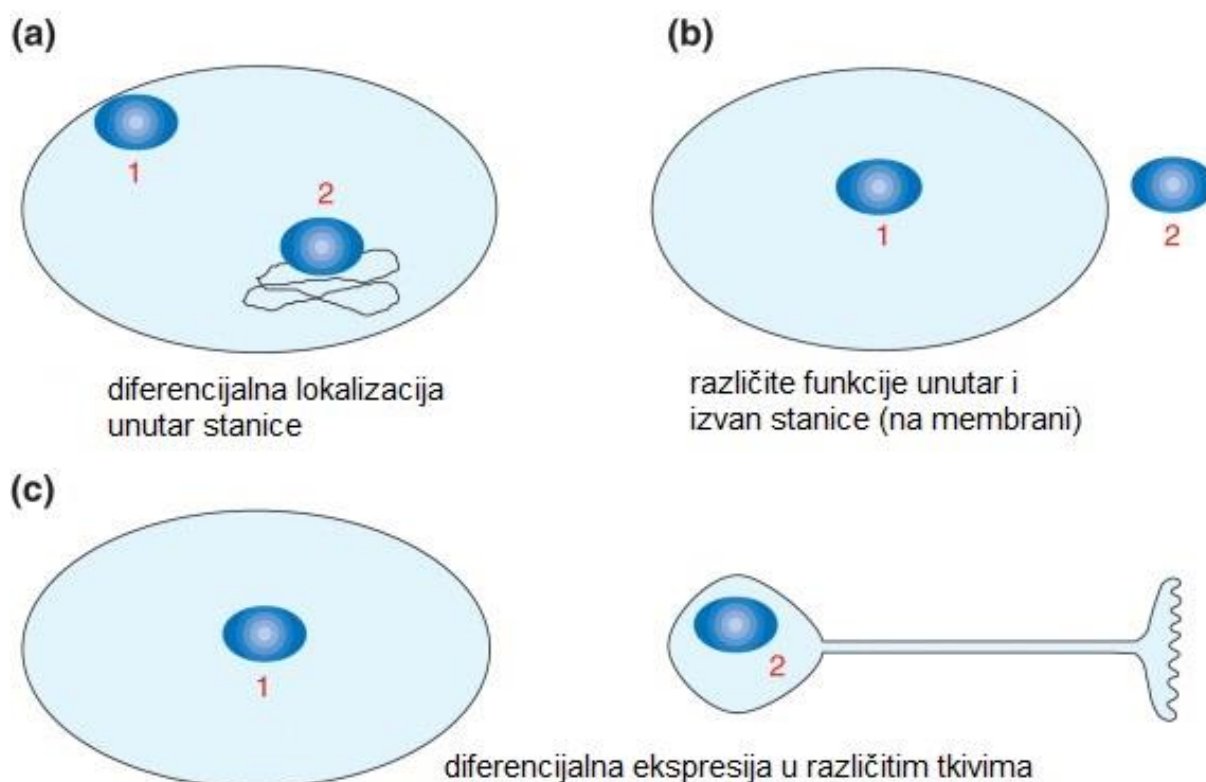
2. Molekulska mnogostranost – definiranje *moonlighting* proteina

Kao što je već napomenuto, postoje mnogi načini na koje priroda može izmaknuti „centralnoj dogmi“, radilo se o genskim fuzijama, proteolitičkim fragmentima ili alternativnom izrezivanju. *Moonlighting* proteini definiraju se kao one vrste proteina koje u različitim uvjetima mogu ispoljiti dvije ili više biokemijski nepovezanih funkcija, *bez* da su nastale na ikoji od gore navedenih načina (Huberts i Klei, 2010). Također ih ne treba miješati s onim proteinima koji posjeduju višestruke funkcije unutar različitih domena, niti s pleiotrofnim učinkom u slučaju utjecaja gena i njihovih produkata na više fenotipskih značajki (Pick i Bramasole, 2014). Ključna stavka kod *moonlighting* proteina jest ta da ni u kojem slučaju ne mogu biti ispoljene obje funkcije proteina (ili više njih) u isto vrijeme. Postoji određena „sklopka“ koja proteinu omogućuje fleksibilnost odabiranja funkcije, primjerice u ovisnosti o okolišnim uvjetima (Huberts i Klei, 2010).

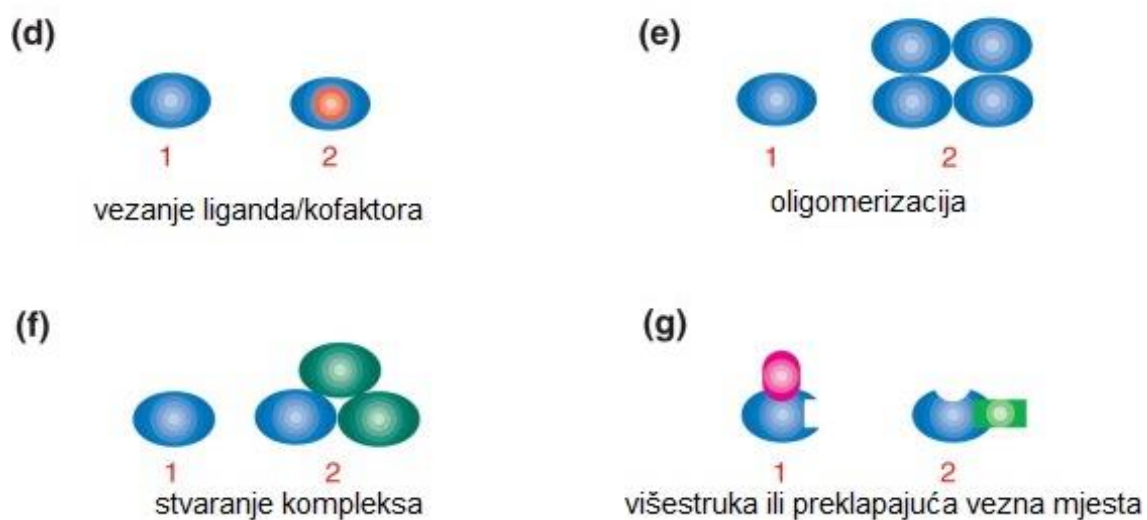
Prvi *moonlighting* protein opisan je krajem 1980-ih, kad su Piatigorsky i Wistow (1989) otkrili podudarnost kristaliničnih proteina leće oka kralježnjaka s dobro poznatim enzimima, alfa-enolazom u slučaju τ -kristalina kornjače (Wistow, 1988) odnosno laktat dehidrogenazom u ϵ -kristalinu patke (Hendriks i sur., 1988). Daljnjim istraživanjima primijećeno je kako su mnogi *moonlighting* proteini evoluirali iz visoko konzerviranih enzima, posebice onih koji su uključeni u katabolizam ugljikohidrata, ili iz proteina uključenih u popravak DNA, transkripciju i translaciju (Jeffery, 1999). Jedan od najvjerojatnijih razloga tomu leži u konzerviranosti tih proteina u svim vrstama, uz činjenicu da se konstitutivno eksprimiraju. Upravo zbog toga postoji veća šansa da će razviti nove funkcije bez ograničavajućih učinaka okoliša koji igra ključnu ulogu u ekspresiji nekonstitutivnih proteina (Baker, 1991).

3. Mehanizmi višezadaćnosti *moonlighting* proteina

Postoji mnogo načina na koje različiti *moonlighting* proteini iskazuju svoje višestruke funkcije (Sl. 2 i 3). U revijalnom radu Jefferyja (1999) navodi se devet mehanizama koji dovode dotične proteine do stanja u kojem mogu promijeniti kanonsku funkciju. Navode se Diferencijalna lokalizacija unutar stanice, različitost funkcija citoplazmatskih proteina na površini stanice, Oligomerizacija, Stvaranje kompleksa, diferencijalna ekspresija u različitim tkivima, Različitost funkcija u ovisnosti o koncentraciji liganda, Preklapajuća vezna mjesta te Regulacija vlastite ekspresije na razini transkripcije ili translacije. U ovom radu posebice će biti stavljen naglasak na bakterijske citoplazmatske proteine koji izvode svoju *moonlighting* funkciju na površini stanice, stoga će u sljedećih nekoliko odlomaka biti izložen primjer za svaki od preostalih navedenih mehanizama.



Slika 2. Primjeri *moonlighting* mehanizama (1), preuzeto s www.cell.com



Slika 3. Primjeri *moonlighting* mehanizama (2), preuzeto s www.cell.com

3.1. Diferencijalna lokalizacija unutar stanice

Citokrom *c* ključni je protein u transportnom lancu elektrona i oksidacijskoj fosforilaciji. Nalazi se u međumembranskom prostoru u mitohondrijima i vrši ulogu prijenosnika visoko energiziranih elektrona na posljednji kompleks transportnog lanca, citokrom *c* oksidazu, na kojoj se izvodi redukcija kisika do vode (Ow *i sur.*, 2008). Međutim, ukoliko stanica primi odgovarajući signal, vanjska membrana mitohondrija postaje propusna za citokrom *c* koji tad u citoplazmi mijenja svoju prvotnu ulogu prijenosnika elektrona i postaje ključan čimbenik u aktivaciji kaspaza, proteina koji izvide programiranu staničnu smrt, apoptozu.

3.2. Oligomerizacija

Primjer *moonlighting* dihidrolipoamid dehidrogenaze (DLD) ukazuje na važnost stvaranja oligomera i dinamičke ravnoteže s monomernim oblikom koji iskazuje drugačiju funkciju. DLD je još jedan mitohondrijski enzim uključen u nekoliko velikih proteinskih kompleksa (piruvat dehidrogenaza, glicin dekarboksilaze) koji igraju važnu ulogu u Krebsovom ciklusu. DLD je u svom kanonskom obliku homodimer i vrši funkciju oksidoreduktaze, dok u slučaju zakiseljavanja mitohondrijskog matriksa uslijed stresnih uvjeta dolazi do raspadanja oligomera na monomere (Babady *i sur.*, 2007, Klyachko *i sur.*, 2005). Takvi monomeri tad posjeduju novu, proteolitičku funkciju zbog izlaganja dviju aminokiselina koje su u oligomeru bile skrivene na području dodira dvaju proteina.

Novoiskazana funkcija DLD-a može često dovesti do komplikacija u pacijentima koji boluju od metaboličkih bolesti povezanih s defektom nekih od ključnih mitohondrijskih enzima. Znanje o njenoj *moonlighting* funkciji usput može doprinijeti razvoju novih lijekova protiv takvih bolesti (Babady *i sur.*, 2007).

3.3. Stvaranje kompleksa

Poneki proteini ispoljavaju različite funkcije ukoliko se vežu za druge proteine pritom tvoreći multikomponentni kompleks. Postoje mnogi primjeri takvih struktura, poput DNA polimeraze III, sintaze masnih kiselina, piruvat dehidrogenaze, i još mnogo drugih. Zanimljiv primjer predstavlja tioredoksin iz bakterije *Escherichia coli* koji je inače uključen u ciklus redukcije ribonukleotida u deoksiribonukleotide i posjeduje oksidoreduktaznu aktivnost. Svoju drugu funkciju dobiva u slučaju vezanja na protein 5 (DNA polimerazu) faga T7, pri čemu se ponaša poput β -kopče DNA polimeraze III. Tioredoksin u kompleksu s tom polimerazom povećava njenu učinkovitost, čime se pospješuje replikacija samog faga (Mark i Richardson, 1976, Bedford *i sur.*, 1997). T7 fag na svojevrsan način „regrutira“ tioredoksin iz *E. coli* kako ne bi trebao kodirati isti ili homologni protein u svojoj DNA.

3.4. Diferencijalna ekspresija u različitim tkivima

Klasični primjer proteina koji eksprimiran u jednom tkivu ima jednu, a u drugom drugu funkciju predstavlja neuropilin. Radi se o membranskom receptoru koji se nalazi na izvanstaničnoj površini epitelnih stanica gdje na sebe veže faktore rasta krvnih žila i općenito sudjeluje u angiogenezi (Guo i Vander Kooi, 2015). S druge strane, ukoliko se eksprimira u neuronima veže drugi ligand – semaforin III. Ta vrsta interakcije ključna je u kemotaktičnom navođenju aksona u njihov pravilan raspored u sklopu viših živčanih struktura (Kolodkin *i sur.*, 1997).

3.5. Različitost funkcija u ovisnosti o koncentraciji liganda

Akonitaza je još jedan od onih proteina ključnih u fundamentalnim metaboličkim putevima, koji je spregnut s alternativnom funkcijom, ovoga puta u ovisnosti o koncentraciji liganda. Radi se o enzimu Krebsovog ciklusa koji katalizira reverzibilnu promjenu citrata u izocitrat posredstvom cis-akonitata, i čije se aktivno mjesto sastoji od Fe-S klastera. U eukariota postoje dvije ortologne varijante akonitaze, citosolna i mitohondrijska, od kojih svaka posjeduje svoju specifičnu *moonlighting* funkciju (Ebi.ac.uk, 2017). Citosolna akonitaza izvodi svoju uobičajenu ulogu pretvorbe citrata u izocitrat, čime utječe na koncentraciju NADPH ključnog u biosintetskim putevima i u antioksidacijskim reakcijama. Ukoliko dođe do poremećaja transporta željeza i njegova koncentracija u citoplazmi padne ispod određene granice, dolazi do disocijacije Fe-S klastera i promijene konformacije samog enzima.

U tom trenutku otvara se dotad skriveno vezno mjesto za mRNA koja kodira transferitinski receptor, najvažniji protein u prijenosu željeza iz izvanstanične okoline u samu stanicu. Dotična mRNA također sadrži sekundarnu strukturu („*iron response element*“, IRE) za koju se veže akonitaza, u tom slučaju zvana „*iron response element-binding protein*“, IREP1, i pojačava njenu ekspresiju na razini translacije ([Beinert i sur., 2010](#)). Mitohondrijska, pak, akonitaza ima potpuno drugačiju ulogu, koja ne ovisi o vezanju liganda, već o redukcijском stanju mitohondrijskog matriksa. Svoju alternativnu funkciju izvodi u sklopu održavanja nukleoidne strukture mitohondrijske DNA, čime direktno može regulirati količinu ekspresije određenih gena uključenih u Krebsov ciklus ili oksidacijsku fosforilaciju, sve u ovisnosti o oksidacijskom stanju i potrebi stanice za energijom ([Shadel, 2005](#))!

3.6. Preklapajuća vezna mjesta

Prethodni primjer citosolne akonitaze zapravo nije „čisti“ primjer *moonlightinga* u uvjetima različite koncentracije liganda. Naime, mjesno-specifičnom mutagenezom aktivnog mjesta i narušavanjem Fe-S klastera dokazano je kako su dvije funkcije proteina neovisne premda je riječ o istom mjestu vezanja/katalize ([Philpott i sur., 1994](#)). Aspartatni receptor *E. coli*, uključen u bakterijsku kemotaksiju, također može vezati i maltozu zahvaljujući svojim preklapajućim, ali različitim veznim mjestima za ta dva liganda ([Mowbray i Koshland, 1990](#)).

3.7. Regulacija vlastite ekspresije

Za mnoge *moonlighting* proteine pronađeno je da osim kanonske katalitičke uloge izvode i onu autoregulacijsku, bilo na razini transkripcije ili translacije vežući se za operatore vlastitih gena ili neprepisane regije vlastite mRNA. Razne bakterije posjeduju plazmide koje moraju držati u konstantnoj i precizno reguliranoj količini u svojim stanicama. Kontrola plazmida s malim brojem kopija vođena je ekspresijom proteina RepE koji se istovremeno može vezati za *oriS* i potaknuti stvaranje replikacijske viljuške i, s druge strane, vezati se za operatorska mjesta uzvodno od vlastitog gena i potaknuti ekspresiju samog sebe ([Matsunaga i sur., 1995](#)). Sve to vrijedi ukoliko se protein nalazi u svom monomernom stanju, koje se održava putem određenog šaperona. U trenutku kad se broj plazmida toliko poveća da ni šaperon ne može održati sve RepE proteine u monomernom stanju, dimeri uzrokuju represiju transkripcije gena *repE*! Dakle protein RepE koristi kombinaciju gore opisanih mehanizama *moonlightinga*, poimence oligomerizaciju (monomer je aktivator, a dimer represor ekspresije *repE*) i formiranje kompleksa s replikacijskim proteinima DNA.

4. Biofizička i biokemijska osnova *moonlighting* fenomena

Prije završne rasprave o bakterijskim adhezivnim proteinima, potrebno je osvrnuti se na prethodne primjere iz jedne biofizičke, odnosno biokemijske perspektive i razmotriti na koji su način dani proteini predodređeni za posjedovanje alternativnih uloga.

4.1. Strukturalna fleksibilnost i intrinzično neuređeni proteini

Promatrajući podatke o različitim *moonlighting* proteinima, jedan od najupečatljivijih zaključaka do kojeg se dolazi jest taj da se u velikoj većini slučajeva radi o proteinima koji su uključeni u esencijalne metaboličke puteve poput glikolize, Krebsova ciklusa, replikacije, transkripcije i translacije, stabilnosti i smatanja proteina. Mnogi proteini spomenutih procesa eksprimirani su konstitutivno i često nose epitet „housekeeping“ – kao takvi postoje već nekoliko stotina milijuna ili nekoliko milijarda godina, u svim domenama života i ne čudi da su mnogi imali vremena razviti dodatnu funkciju (Copley, 2014). Međutim, nedavna istraživanja ukazuju na veliku povezanost strukturalne fleksibilnosti samih proteina i intrinzično neuređenih regija u sposobnosti *moonlightinga* (Tompa i sur., 2005). U navedenom radu Tompa i suradnici (2005) povezuju promiskuitetnu prirodu vezanja različitih liganada za intrinzično neuređene regije sa sposobnošću posjedovanja alternativnih funkcija. Tu činjenicu dodatno potvrđuje nepostojanost specifičnih motiva i aminokiselinskih sekvenci koje bi osigurali sigurni put evoluciji *moonlightinga* (Huberts i Klei, 2010).

4.2. Posttranslacijske modifikacije kao ključ u ispoljavanju alternativnih funkcija

Proteini svoj „molekulski život“ započinju kao svježe prepisani i pravilno smotani polipeptidni lanci, no mnogi moraju proći i značajnu količinu kemijskih modifikacija kako bi postali aktivni u svojoj staničnoj ulozi. Riječ je o dodavanju jednostavnih kemijskih grupa poput fosfata, metilne ili acetatne skupine ili pak proteolitičkoj aktivaciji, među mnogim ostalim primjerima. Posttranslacijske modifikacije kao takve mogu, osim aktivacije kanonske uloge dovesti i do ispoljavanja biokemijski nepovezane zadaće koje karakteriziraju proteinski *moonlighting* (Jeffery, 2016). Spomenuti revijalni rad posebice ističe kako takav tip kemijske transformacije može dovesti do gašenja ili paljenja jednog od dva metabolička puta u kojem sudjeluje *moonlighting* protein radi svoje višezadačnosti. Na taj način stanica može jednostavno i učinkovito reagirati te se prilagoditi na nagle promjene svog okoliša, bez potrebe za sintezom novih proteina s odvojenim zadaćama.

4.3. Utjecaj točkastih mutacija

Ponekad se u nekom genu dogodi točkasta mutacija koja u proteinskom produktu dovede do nastanka takozvane „neomorfne“ *moonlighting* funkcije koje ne moraju uvijek biti korisne stanici ili organizmu (Jeffery, 2011). Dapače, mnoge takve neomorfne funkcije mogu dovesti do razvoja raznih bolesti pa čak i raka, u primjeru točkaste mutacije izocitrat dehidrogenaze (IDH) (Uhm, 2009). Taj enzim je sudionik Krebsovog ciklusa te je dokazano kako mutacija arginina u katalitičkom mjestu oba izozima (IDH1 i IDH2) uzrokuje pojavu glioma i ponekad mijeloidne leukemije. Umjesto oksidacije izocitrata u α -ketoglutarat, mutirani enzimi dovode do nastanka onkometabolita 2-hidroksiglutarata koji djeluje inhibirajuće na histone i DNA metilirajuće enzime (Uhm, 2010).

4.4. Genske duplikacije i homologni proteini s različitim ulogama

Jedan on najproduktivnijih načina na koji evolucijom općenito nastaju proteini s novim ulogama jest genska duplikacija (Chandan i Indra, 2014). Na taj način stanici se daje novi DNA materijal kojeg se može mutirati i selekcionirati. Evolucija mnogih poznatih porodica proteina, poput Hox transkripcijskih faktora, globina i DNA polimeraza uzrokovana je upravo tim mehanizmom. Duplikacijom se jednako tako može razriješiti i stres koji na stanicu katkad provode proteini s više zadaća, budući da je onda učinkovitija regulacija svake od dviju ili više zadaća (Babady i sur., 2007). Primjer jedne takve duplikacije gena jesu delta 1 i delta 2 kristalini koje eksprimiraju stanice leće pataka. Budući da su oba proteina nastala dupliciranjem i naknadnom mutacijom gena za argininosukcinat lijazu dijele čak 94% identičnih aminokiselina, s time da delta 1 ne može sudjelovati u ciklusu ureje gdje vrši svoju kanonsku ulogu. Ciljanom mutagenезom odgovarajućih petlji ili pak pojedinačnim točkastim mutacijama moguće je uvesti *moonlighting* funkciju nazad u delta 1 protein (Tsai i sur., 2005).

5. Bakterijski adhezivni proteini – primjeri *moonlighting*-a unutarstaničnih proteina na staničnoj površini

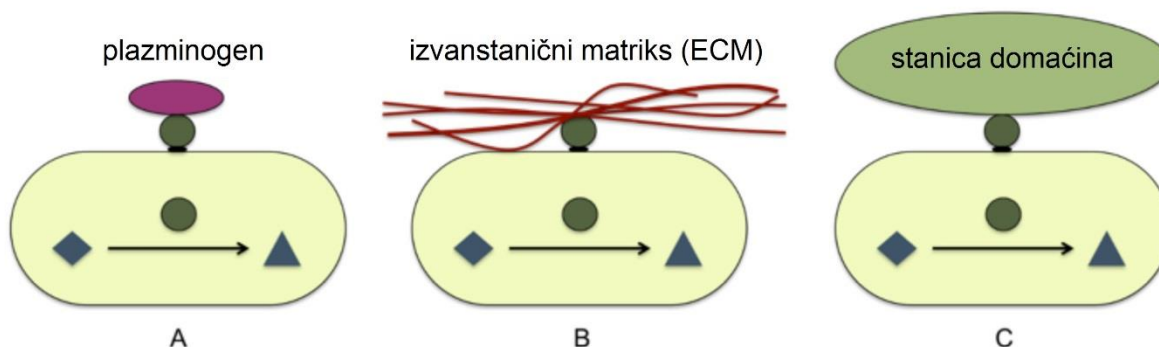
Bakterije u velikoj većini slučajeva žive blisko povezane u zajednicama koje prijanjaju za različite površine pritom stvarajući biofilme. Adhezija je neophodna u kolonizaciji anorganskih površina jednako kao i tkiva mnogostaničnih organizama, posebice u patogenih sojeva. Upravo je zbog toga zanimljivo istraživati površinske proteine uključene u adheziju za koje se zna da sudjeluju i u unutarstaničnim metabolički nepovezanim procesima.

5.1. Raznovrsnost uloga bakterijskih adhezivnih proteina

Uzevši u obzir bakterije u suživotu s animalnim eukariotskim organizmima, postoje tri glavne uloge adhezivnih proteina – prijanjanje za izvanstanični matriks (eng. *extracellular matrix*, ECM) i epitelne stanice domaćina, interakcija s proteinima krvožilnog, limfnog i imunskog sustava (Sl. 4) (Kainulainen i Korhonen, 2014). Istraživanjima površinskih *moonlighting* proteina ustanovljeno je da mnoge komenzalne bakterije posjeduju proteine veoma slične strukture i funkcije kao i one patogene (Heinemann, 2000). Time se dodatno potvrđuje hipoteza površinskog isključenja koja nalaže da u obrani od patogena značajnu ulogu igra količina komenzalnih bakterija na danoj površini. One svojom brojnošću stvaraju kompetitivan okoliš u kojem je otežana kolonizacija i razmnožavanje patogena (Servin, 2004).

Veoma učestala i važna interakcija u kojoj sudjeluju površinski *moonlighting* proteini jest vezanje plazminogena, proteina koji je dio plazme krvožilnog sustava domaćina i čija se proteolitička aktivacija u plazmin pospješuje vezanjem za dotične proteine bakterijskih stanica (Bhattacharya i sur., 2012). Plazmin je inače uključen u degradaciju ugrušaka proteolitičkim cijepanjem fibrina. Osim toga, može aktivirati enzime koji napadaju komponente ECM-a i vezivnog tkiva, što u konačnici bakterijama koje se navedenim trikom služe omogućuje bolju adhezivnost i uspješniju kolonizaciju tkiva (Lähteenmäki i sur., 2005). S druge strane, u nekim je sojevima primijećeno da ne dolazi nužno do aktivacije plazminogena, već da sam plazminogen veže integrine ECM-a i time također pospješuje prijanjanje za površine (Sanderson-Smith i sur., 2012).

Jednako kao što trebaju osigurati postojanu adheziju za ciljano tkivo, patogeni moraju moći izbjeći imunom odgovoru domaćina. Najzanimljiviji primjer definitivno predstavlja enolaza pneumokoka, koja posjeduje odvojene regije za vezanje plazminogena i C4-vezujućeg proteina (eng. *C4 binding protein*, C4BP) (Agarwal i sur., 2011). Taj protein je jedan od glavnih inhibitora djelovanja komplementa, učesnika prirodno stečene imunosti koji nadopunjuje djelovanje antitijela i fagocitičkih stanica. Protein C4BP sudjeluje u inhibiciji proteina C4 koji igra glavnu ulogu u stvaranju transmembranskih pora u bakterija čime ih osmotski razara. Dinis i suradnici (2009) proveli su istraživanje u kojem su iskoristili rekombinantnu enolazu bakterije *Streptococcus sobrinus* u imunizaciji štakora protiv dentalnog karijesa – primijećena je povećana koncentracija antitijela IgA i IgG u njihovoj slini (Dinis i sur., 2009). Veoma je uzbudljivo pomisliti o mogućoj primjeni sličnog sustava u ljudi.



Slika 4. Različiti načini na koji bakterijski *moonlighting* proteini vrše adhezivnu ulogu, preuzeto s www.atlasofscience.org

5.2. Problematika translokacije citoplazmatskih proteina na staničnu površinu

Bakterijski *moonlighting* proteini koji iskazuju svoju alternativnu ulogu na površini stanice ne posjeduju karakteristične signalne slijedove koje inače karakteriziraju proteine usmjerene prema membrani ili izvan stanice. (Copley, 2012). Danas su se iskristalizirale dvije jednako valjane i ne nužno isključive pretpostavke – jedna nalaže da se citoplazmatski proteini s adhezivnom *moonlighting* funkcijom translociraju dosad neopisanim mehanizmima. Druga polazi od činjenice da mnoge bakterijske stanice uslijed šoka kolonizacije tkiva domaćina liziraju i ispuste sadržaj svoje citoplazme u okoliš, iz kojega tada druge bakterije mogu asociirati dotične proteine na svoju površinu i iskoristiti ih u adhezivnoj ulozi (Kainulainen i Korhonen, 2014). Prvoj, sekrecijskoj hipotezi, u prilog govori primjer gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (eng. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH) Bakterija

Streptococcus pyogenes, kojoj je translokacija odnosno pojavnost na staničnoj površini onemogućena ukoliko joj se doda hidrofobni rep od samo 12 aminokiselina na C-kraj (Böel i sur., 2005). Jednako tako, enolaze različitih bakterija mogu biti posttranslacijski modificirane vlastitim supstratom, 2-fosfogliceratom. Ako se mutira dano mjesto vezanja 2-fosfoglicerata, sprječava se i translokacija samog enzima u izvanstanični prostor (Böel i sur., 2004). Oba primjera ukazuju na važnost strukture i posttranslacijskih modifikacija u translokaciji unutarstaničnih proteina na staničnu površinu.

Drugu mogućnost translociranja predstavlja hipoteza otpuštanja unutarstaničnih proteina iz traumatiziranih stanica, koji tada mogu asociirati s površinskim strukturama membrana bakterija u okolini i iskazati svoju alternativnu funkciju. U radu Saada i suradnika (2009) otkriveno je kako količina GAPDH asociiranog s površinom bakterija *Lactobacillus plantarum* direktno ovisi o propusnosti membrana uslijed kasnijih faza rasta (Saad, 2009). Shodno tomu, dokazano je da čimbenici koji pospješuju lizu stanica, poput penicilina i Tritona X-100, istovremeno povećavaju količinu GAPDH prisutnu na površini stanica (Oliveira i sur., 2012).

5.3. Uloga ionskih interakcija u adheziji proteina na staničnu površinu

Ionske interakcije predstavljaju niz elektrostatskih fenomena koji mogu djelovati između dvaju proteina ili općenito (makro)molekula koje posjeduju nabijene ili parcijalno nabijene regije (Van Holden i Johnson, 2006). Jačina ionske interakcije ne ovisi samo o količini naboja i udaljenosti molekula, već i o okolišnim uvjetima poput vrijednosti pH. Izoelektrična točka proteina je odlučujući faktor sveukupne nabijenosti makromolekule u danim uvjetima. Bakterije roda *Lactobacillus* žive u anaerobnim uvjetima i fermentiraju glukozu do laktoze, prilikom čega dolazi do zakiseljavanja okoliša u kojem se nalaze (Vaughan i sur., 2002). Nedavna istraživanja pokazala su kako je njihova adhezija na različita epitelna tkiva u direktnoj korelaciji sa zakiseljavanjem okoline, stoga se može doći do zaključka kako mnogi *moonlighting* proteini asociiraju s membranama bakterija zbog promijene svoje ukupne nabijenosti (Kainulainen i sur., 2012).

Istraživanja Kainulainen i suradnika (2012) pokazala su kako GAPDH, glutamin sintetaza (GS) i glukoza-6-fosfat izomeraza (GPI) disociraju sa površina stanica vrste *Lactobacillus crispatus* ukoliko ih se uzgaja na neutralnom ili lužnatom mediju. Razlog leži u tome što se izoelektrična točka spomenutih proteina kreće oko vrijednosti 5, stoga postaju pozitivno nabijeni u kiselijem okolišu pH vrijednosti ispod 5. Kao takvi mogu se vezati za negativno nabijenu liopteihoičnu kiselinu, čestu komponentu membrana gram-pozitivnih bakterija (Antikainen i sur., 2007).

Nadalje, istraživanja Kainulainen i suradnika (2012) ukazala su da je osim vrijednosti pH okoline važna i sama površinska arhitektura membrana bakterijskih stanica. Promotрили su kako se najveći broj proteina GS obilježenih s His₆ vezao za područja diobe stanica i stanične polove. Iznose zanimljivu hipotezu da bi se *moonlighting* proteini mogli prenositi upravo na tim mjestima kroz membranu, dosad još neistraženim mehanizmom, budući da upravo te regije sadrže površinske karakteristike različite od ostatka membranske površine (Bierne i Dramsi, 2012).

6. Zaključne riječi – zašto istraživati *moonlighting* proteine?

U konačnici bi se moglo zaključiti kako još mnogo toga ostaje neotkriveno po pitanju bakterijskih i općenito *moonlighting* proteina, premda su mnogi zanimljiv primjer ingenioznosti prirode koja nam na poznatom terenu skriva nova iznenađenja. Korist istraživanja proteina s više funkcija je više nego jasna, budući da su mnogi uključeni u patološke procese, jednako kao i u umrežavanje metabolizma na jednoj razini koje do nedavno nismo bili svjesni. Većina budućih istraživanja proteomike i metabolomike neće moći izbjeći činjenicu da postoje proteini koji se mogu baviti dvjema ili više nepovezanim zadaćama i dodatno komplicirati interpretaciju dobivenih rezultata.

7. Literatura

- Agarwal, V., Hammerschmidt, S., Bergmann, S., Riesbeck, K. and Blom, A. (2011). Alpha-Enolase of *Streptococcus Pneumoniae* Binds the Human Complement Inhibitor C4-Binding Protein and Mediates Pneumococcal Complement Evasion. *Molecular Immunology*, 48(14), p.1698.
- Antikainen, J., Kupannen, V., Lahteenmaki, K. and Korhonen, T. (2007). pH-Dependent Association of Enolase and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Lactobacillus crispatus* with the Cell Wall and Lipoteichoic Acids. *Journal of Bacteriology*, 189(12), pp.4539-4543.
- Babady, N., Pang, Y., Elpeleg, O. and Isaya, G. (2007). Cryptic Proteolytic Activity of Dihydrolipoamide Dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(15), pp.6158-6163.
- Baker, H. (1991). GCR1 of *Saccharomyces cerevisiae* Encodes a DNA Binding Protein Whose Binding is Abolished by Mutations in the CTTCC Sequence Motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(21), pp.9443-9447.
- Bedford, E., Tabor, S. and Richardson, C. (1997). The Thioredoxin Binding Domain of Bacteriophage T7 DNA Polymerase Confers Processivity on *Escherichia coli* DNA Polymerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(2), pp.479-484.
- Beinert, H., Kennedy, M. and Stout, C. (2010). Aconitase as Iron-Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein. *ChemInform*, 28(10), p.1442-1449.
- Berget, S., Moore, C. and Sharp, P. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(8), pp.3171-3175.
- Bhattacharya, S., Ploplis, V. and Castellino, F. (2012). Bacterial Plasminogen Receptors Utilize Host Plasminogen System for Effective Invasion and Dissemination. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, pp.1-19.
- Bierne, H. and Dramsi, S. (2012). Spatial Positioning of Cell Wall-Anchored Virulence Factors in Gram-Positive Bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 15(6), pp.715-723.
- Bishop, D.H. (1986). Ambisense RNA Viruses: Positive and Negative Polarities Combined in RNA Virus Genomes. *Microbiological Sciences*, 3(6), pp.183-187.
- Boel, G., Jin, H. and Pancholi, V. (2005). Inhibition of Cell Surface Export of Group A Streptococcal Anchorless Surface Dehydrogenase Affects Bacterial Adherence and Antiphagocytic Properties. *Infection and Immunity*, 73(10), pp.6237-6248.

- Boël, G., Pichereau, V., Mijakovic, I., Mazé, A., Poncet, S., Gillet, S., Giard, J., Hartke, A., Auffray, Y. and Deutscher, J. (2004). Is 2-Phosphoglycerate-dependent Automodification of Bacterial Enolases Implicated in their Export? *Journal of Molecular Biology*, 337(2), pp.485-496.
- Chandan, R. and Indra, D. (2014). Gene Duplication: A Major Force in Evolution and Biodiversity. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 6(1), pp.41-49.
- Chow, L., Gelinas, R., Broker, T., Roberts, R. (1977). An Amazing Sequence Arrangement at the 5'-Ends of Adenovirus 2 Messenger RNA. *Cell*, 12(1), pp.1-8.
- Copley, S. (2012). Moonlighting is Mainstream: Paradigm Adjustment Required. *BioEssays*, 34(7), pp.578-588.
- Copley, S. (2014). An Evolutionary Perspective on Protein Moonlighting. *Biochemical Society Transactions*, 42(6), pp.1684-1691.
- Crick, F. (1958). On Protein Synthesis. *The Symposia of the Society for Experimental Biology*, 12, pp.138-163
- Crick, F. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*, 227(5258), pp.561-563.
- Ebi.ac.uk. (2017). [online] Available at:
https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2007_5/Page2.htm [pristup 7.9. 2017.]
- Guo, H. and Vander Kooi, C. (2015). Neuropilin Functions as an Essential Cell Surface Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 290(49), pp.29120-29126.
- Heinemann, C. (2000). Purification and Characterization of a Surface-Binding Protein from *Lactobacillus fermentum* RC-14 that Inhibits Adhesion of *Enterococcus faecalis* 1131. *FEMS Microbiology Letters*, 190(1), pp.177-180.
- Hendriks, W., Mulders, J., Bibby, M., Slingsby, C., Bloemendal, H. and de Jong, W. (1988). Duck Lens Epsilon-Crystallin and Lactate Dehydrogenase B4 are Identical: A Single-Copy Gene Product with Two Distinct Functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(19), pp.7114-7118.
- Huberts, D. and van der Klei, I. (2010). Moonlighting Proteins: An Intriguing Mode of Multitasking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(4), pp.520-525.
- Jeffery, C. (1999). Moonlighting Proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(1), pp.8-11.
- Jeffery, C. (2011). Proteins with Neomorphic Moonlighting Functions in Disease. *IUBMB Life*, 63(7), pp.489-494.

- Jeffery, C. (2016). Protein Species and Moonlighting Proteins: Very Small Changes in a Protein's Covalent Structure Can Change Its Biochemical Function. *Journal of Proteomics*, 134, pp.19-24.
- Kainulainen, V. and Korhonen, T. (2014). Dancing to Another Tune—Adhesive Moonlighting Proteins in Bacteria. *Biology*, 3(1), pp.178-204.
- Kainulainen, V., Loimaranta, V., Pekkala, A., Edelman, S., Antikainen, J., Kylvaja, R., Laaksonen, M., Laakkonen, L., Finne, J. and Korhonen, T. (2012). Glutamine Synthetase and Glucose-6-Phosphate Isomerase Are Adhesive Moonlighting Proteins of *Lactobacillus crispatus* Released by Epithelial Cathelicidin LL-37. *Journal of Bacteriology*, 194(10), pp.2509-2519.
- Klyachko, N., Shchedrina, V., Efimov, A., Kazakov, S., Gazaryan, I., Kristal, B. and Brown, A. (2005). pH-dependent Substrate Preference of Pig Heart Lipoamide Dehydrogenase Varies with Oligomeric State. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), pp.16106-16114.
- Kolakofsky, D. (2015). A Short Biased History of RNA Viruses. *RNA*, 21(4), pp.667-669.
- Kolodkin, A., Levengood, D., Rowe, E., Tai, Y., Giger, R. and Ginty, D. (1997). Neuropilin Is a Semaphorin III Receptor. *Cell*, 90(4), pp.753-762.
- Lähteenmäki, K., Edelman, S. and Korhonen, T. (2005). Bacterial Metastasis: The Host Plasminogen System in Bacterial Invasion. *Trends in Microbiology*, 13(2), pp.79-85.
- Mark, D. and Richardson, C. (1976). *Escherichia coli* Thioredoxin: A Subunit of Bacteriophage T7 DNA Polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(3), pp.780-784.
- Matsunaga, F., Kawasaki, Y., Ishiai, M., Nishikawa, K., Yura, T. and Wada, C. (1995). DNA-Binding Domain of The Repe Initiator Protein of Mini-F Plasmid: Involvement of the Carboxyl-Terminal Region. *Journal of Bacteriology*, 177(8), pp.1994-2001.
- Mitelman, F., Johansson, B. and Mertens, F. (2007). The Impact of Translocations and Gene Fusions on Cancer Causation. *Nature Reviews Cancer*, 7(4), pp.233-245.
- Moller, D., Yokota, A., Caro, J. and Flier, J. (1989). Tissue-Specific Expression of Two Alternatively Spliced Insulin Receptor mRNAs in Man. *Molecular Endocrinology*, 3(8), pp.1263-1269.
- Mowbray, S. L. and Koshland, D.E., Jr (1990). Mutations in the Aspartate Receptor of *Escherichia coli* Which Affect Aspartate Binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, pp.15638-15643

- Oliveira, L., Madureira, P., Andrade, E., Bouaboud, A., Morello, E., Ferreira, P., Poyart, C., Trieu-Cuot, P. and Dramsi, S. (2012). Group B Streptococcus GAPDH Is Released upon Cell Lysis, Associates with Bacterial Surface, and Induces Apoptosis in Murine Macrophages. *PLoS ONE*, 7(1), p.e29963.
- Ow, Y., Green, D., Hao, Z. and Mak, T. (2008). Cytochrome c: Functions Beyond Respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(7), pp.532-542.
- Philpott, C., Klausner, R. and Rouault, T. (1994). The Bifunctional Iron-Responsive Element Binding Protein/Cytosolic Aconitase: The Role of Active-Site Residues in Ligand Binding and Regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15), pp.7321-7325.
- Piatigorsky, J., Wistow, G. (1989). Enzyme/Crystallins: Gene Sharing as an Evolutionary Strategy. *Cell*, 57(2), pp.197-199.
- Pick, E., Bramasole, L. (2014). Moonlighting and Pleiotropy Within Two Regulators of the Degradation Machinery: The Proteasome Lid and the CSN. *Biochemical Society Transactions*, 42(6), pp.1786-1791.
- Saad, N. (2009). *Lactobacillus plantarum* 299v Surface-Bound GAPDH: A New Insight into Enzyme Cell Walls Location. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(12), pp.1635-1643.
- Sanderson-Smith, M., De Oliveira, D., Ranson, M. and McArthur, J. (2012). Bacterial Plasminogen Receptors: Mediators of a Multifaceted Relationship. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, pp.1-14.
- Servin, A. (2004). Antagonistic Activities of Lactobacilli and Bifidobacteria Against Microbial Pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4), pp.405-440.
- Shadel, G. (2005). Mitochondrial DNA, Aconitase ‘Wraps’ It Up. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(6), pp.294-296.
- Tompa, P., Szász, C. and Buday, L. (2005). Structural Disorder Throws New Light on Moonlighting. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(9), pp.484-489.
- Tsai, M., Koo, J. and Howell, P. (2005). Recovery of Argininosuccinate Lyase Activity in Duck $\delta 1$ Crystallin \dagger . *Biochemistry*, 44(25), pp.9034-9044.
- Uhm, J. (2009). IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *Yearbook of Neurology and Neurosurgery*, 2009, pp.119-120.
- Uhm, J. (2010). Cancer-Associated IDH1 Mutations Produce 2-Hydroxyglutarate. *Yearbook of Neurology and Neurosurgery*, 2010, pp.111-112.
- Van Holde, K., Ho, P. and Johnson, W. (2006). *Principles of Physical Biochemistry*. Upper Saddle River, N.J: Pearson Education International.

- Vassar, R. (1999). Beta-Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. *Science*, 286(5440), pp.735-741.
- Vaughan, E., de Vries, M., Zoetendal, E., Ben-Amor, K., Akkermans, A. and de Vos, W. (2002). The Intestinal LABs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1/4), pp.341-352.
- Wistow, G. (1988). Tau-Crystallin/Alpha-Enolase: One Gene Encodes Both an Enzyme and a Lens Structural Protein. *The Journal of Cell Biology*, 107(6), pp.2729-2736.

8. Sažetak

Moonlighting proteini predstavljaju zanimljivu skupinu proteina koji zaobilaze klasičnu formulaciju „jedan gen – jedan protein – jedna funkcija“ izvodeći dvije ili više biokemijski nepovezanih zadaća. Ne uključuju proteine nastale genskim fuzijama, alternativnim izrezivanjem, proteolizom ili onima koji posjeduju višestruke funkcije unutar različitih domena ili pak uzrokuju pleiotropni učinak na fenotip. Često je riječ o proteinima koji su uključeni u esencijalne metaboličke procese poput glikolize, Krebsova ciklusa, smatanja i stabilnosti dugih proteina, transkripciju i translaciju, itd. Postoje različiti mehanizmi na koje može doći do ispoljavanja i promjene između kanonske i *moonlighting* funkcije, od kojih je u ovom seminaru najznačajniji onaj koji uključuje unutarstanične proteine s alternativnom funkcijom na staničnoj površini. Biofizička osnova proteinske multifunkcionalnosti leži u posttranslacijskim modifikacijama, točkastim mutacijama ili duplikaciji gena koji prolazi niz mutacija i poprima drugu funkciju. Bakterije koriste površinski asocirane *moonlighting* proteine kako bi pospješili svoju adhezivnost i kolonizaciju tkiva, bilo vezanjem za komponente izvanstaničnog matriksa, vezujući plazminogen ili pak koju od komponenata imunosnog sustava, čime ga mogu i utišati. U bakterija je do dan danas ostalo otvoreno pitanje njihova transporta budući da ne posjeduju karakteristične signalne sekvence za translokaciju. Važnost istraživanja dotičnih proteina je višestruka – za mnoge se pokazalo kako mogu biti glavni uzročnici patogenosti i katkad poticati razvoj tumora, dok s druge strane, mnogi umrežuju metaboličke puteve na nepredvidive načine koji su od velikog značaja u bilo kakvom istraživanju sistematske biologije na razini proteomike i metabolomike.

9. Summary

Moonlighting proteins represent an interesting group of proteins which do not follow the classical formulation „one gene – one protein – one function“ by simultaneously performing two or more biochemically unrelated tasks. They do not include those proteins that have been genetically fused, alternatively spliced or proteolytically cut, or those that contain multiple functions within different domains or exert pleiotropic effect on phenotype. It's common for *moonlighting* proteins to be part of an essential metabolic pathway such as glycolysis, Krebs cycle, folding and stabilising of other proteins, transcription and translation, etc. There are plenty of mechanisms which moonlighting proteins use to switch between their canonical and alternative functions, of which the most important for this seminary is the execution of alternative function when outside of the cell, commonly attached to the plasma membrane. Biophysical fundaments on which moonlighting effect occurs include post-translational modifications, point mutations or gene duplications which make an alternate version of an original protein with an added moonlighting function. Bacteria use surface-associated moonlighting proteins to adhere to extracellular matrix of host epithelial cell, to activate plasminogen or even to evade host immune response by binding certain proteins of the immune system. Even to this day there are still no clues to how bacteria translocate their intracellular proteins outside of the cell without any signal sequence. The importance of research in the field of moonlighting is multifaceted – some have been observed to cause disease and cancer, others on the contrary make the web of metabolism more complex and intertwined by connecting distant pathways. The latter is very important to have in mind before attempting any systems biology approach.